

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 9月25日

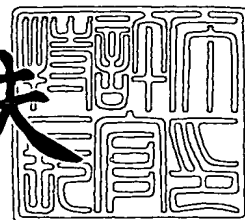
出願番号
Application Number: 特願2003-333072
[ST. 10/C]: [JP 2003-333072]

出願人
Applicant(s): 東洋紡績株式会社

2004年 1月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3000722

【書類名】 特許願
【整理番号】 CN03-0655
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01J 1/00
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社内
 【氏名】 京 基樹
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社内
 【氏名】 宝田 裕
【特許出願人】
 【識別番号】 000003160
 【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社
 【代表者】 津村 準二
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 000619
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

複数の金属結合性官能基を有する親水性高分子が表面に結合しているバイオチップ

【請求項 2】

親水性高分子の分子量が 1, 0 0 0 以上である請求項 1 記載のバイオチップ

【請求項 3】

親水性高分子が枝分かれしている請求項 1 ～ 2 いずれか記載のバイオチップ

【請求項 4】

親水性高分子がポリエチレングリコールを含んでいる高分子である請求項 1 ～ 3 いずれか記載のバイオチップ

【請求項 5】

金属結合性官能基がチオール基あるいはジスルフィド基である請求項 1 ～ 4 いずれか記載のバイオチップ

【請求項 6】

チップ表面が金である請求項 1 ～ 5 いずれか記載のバイオチップ

【請求項 7】

チップの基板が透明基板である請求項 1 ～ 6 いずれか記載のバイオチップ

【請求項 8】

チップ上が生体分子を固定化する部分（固定化部）と、生体分子を固定化しないバックグラウンド部に区画化されており、バックグラウンド部に、複数の金属結合性官能基を有する親水性高分子が表面に結合している請求項 1 ～ 7 いずれか記載のバイオチップ

【書類名】明細書

【発明の名称】バイオチップ

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体分子の非特異的吸着を抑制したバイオチップに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、生体分子の相互作用解析、発現分子のプロファイリング、もしくは診断に用いるバイオチップが注目を集めている。基板上に生体分子が固定化されることで操作が容易になり、場合によっては非常に多くの物質の相互作用を解析することができる。

【0003】

チップ基板には生体分子だけではなく、親水性物質が固定化される方法が発明されている。たとえば特許文献1には区画された部位にDNAが、その他の部分にポリエチレングリコールが固定化されたバイオチップアレイが示されている（例えば、特許文献1参照）。DNAが固定化されていない部位への非特異的吸着を抑制し、DNAハイブリダイゼーション、さらには蛋白との相互作用の解析に成功している。しかし、この方法では一旦保護基を全面に固定化した後に紫外線照射により区画化、DNAを固定化した後に周囲部の保護基を外し、反応性官能基であるスクシニミド基を有するポリエチレングリコール（PEG）を固定化する。よってチップ作製は非常に煩雑であり、多くのステップが必要である。

【0004】

文献ではチオール末端であるポリエチレンオキサイド（ポリエチレングリコール）の単分子層が蛋白吸着を抑制することを報告している（例えば、非特許文献1参照）。この発明に用いられたポリエチレングリコールは3～4の繰り返し単位を有し、炭素数11のアルキル鎖、末端に金属結合性官能基であるチオール基が設けられている。しかし、このような化合物は疎水性部のアルキル鎖と親水性部のPEG鎖を有するため、合成は困難である。場合によってはミセルを形成し、バイオチップ表面への結合を制御するのが難しい場合がある。

【0005】

また、先行特許では分子量1,000以上のPEGとアルキル鎖を有する化合物をバイオセンサーに用いる方法が提供されている（例えば、特許文献2参照）。しかし、アルキル鎖が6以上の場合は非特許文献1と同様に合成が困難となる問題点を有する。また、アルキル鎖が7以下の場合は、アルキル鎖間の疎水性相互作用による自己組織化単分子層（Self-assembled monolayer）の形成が不十分であり、分子が容易に脱離する問題点を有する。

よって、容易にかつ安価に非特異的吸着を抑制されたバイオチップが求められている。

【0006】

【特許文献1】米国特許6127129号明細書

【特許文献2】国際公開第01/86301号パンフレット

【非特許文献1】Primeら J. Am. Chem. Soc. 115巻、10714-10721頁、1993年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、生体分子の非特異的吸着を抑制するバイオチップを得ることにある。特に表面プラズモンイメージング測定に用いた際に、バックグラウンドとのコントラストが高く、吸着・結合等の測定が容易に行えるバイオチップを得ることにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは鋭意検討した結果、以下に示す手段により、上記課題を解決できることを

見出した。

1. 複数の金属結合性官能基を有する親水性高分子が表面に結合しているバイオチップ
2. 親水性高分子の分子量が1,000以上である1記載のバイオチップ
3. 親水性高分子が枝分かれしている1～2いずれか記載のバイオチップ
4. 親水性高分子がポリエチレングリコールを含んでいる高分子である1～3いずれか記載のバイオチップ
5. 金属結合性官能基がチオール基あるいはジスルフィド基である1～4いずれか記載のバイオチップ
6. チップ表面が金である1～5いずれか記載のバイオチップ
7. チップの基板が透明基板である1～6いずれか記載のバイオチップ
8. チップ上が生体分子を固定化する部分（固定化部）と、生体分子を固定化しないバックグラウンド部に区画化されており、バックグラウンド部に、複数の金属結合性官能基を有する親水性高分子が表面に結合している1～7いずれか記載のバイオチップ

【発明の効果】

【0009】

本発明により、1ステップで親水性高分子をバイオチップ表面に結合させることができるだけでなく、親水性高分子は複数の金属結合性官能基を有するためにチップ表面から脱離しにくく、非特異的吸着を大きく低減させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明のバイオチップは、複数の金属結合性官能基を有する親水性高分子が表面に結合している。一分子あたりの金属結合性官能基が複数であるため、該親水性高分子を金属表面に結合させた場合、すべての結合が同時に破壊されない限り、親水性高分子が金属表面から脱離することはない。従って、本発明で用いる親水性高分子は安定性に優れるため好ましい。

【0011】

特許文献1にみられるような、区画化されたバイオチップを作製する場合、複数の金属結合性分子の溶液に、段階的に浸漬させる手段を取る。金属に結合している分子と溶液中の分子の交換反応が起こることが知られており、金属に結合する分子が容易に解離すると、区画化する意味がないため好ましくない。本発明で用いる親水性高分子は、区画化されたバイオチップで特に効果を発揮する。

【0012】

本発明で使用する親水性高分子の一分子あたりの金属官能基は複数であることから2個以上であるが、好ましくは3個以上であり、上限は好ましくは16個以下より好ましくは10個以下である。3個以上であると、金属表面から解離する確率が減少するため好ましい。しかし、17個以上であると、金属表面に結合していないフリーの金属結合性官能基が増加するため好ましくない。例えば、金属結合性官能基としてチオール基を選択する場合、フリーのチオール基が多数存在すると、マレイミド基を有する架橋剤を用いてチオール基を有する生体分子を固定化する手段には応用し難くなり、好ましくない。

【0013】

親水性高分子と金属結合性官能基の間の結合、アルキル鎖の長さは特に限定されるものではないが、本発明の場合、金属表面での安定性が高いため、アルキル鎖を長くする必要はない。

【0014】

親水性高分子の分子量は数平均で1,000以上であることが好ましい。1,000未満である場合、バイオチップ表面が十分に親水性でなく、非特異吸着を抑制することができない場合があるからである。親水性高分子の分子量の上限は特に定めるものではないが、分子量が20,000を越えると、溶液の粘性が上昇し、高分子が絡み合ったまま表面に固定化されることがある。共有結合で固定化されていない高分子が徐々に脱離するために、センサーのベースラインが変化することがあり、好ましくない。なお、数平均分子量

は、GPCにより測定したもので、標準資料としてポリエチレングリコールを用いる。

【0015】

親水性高分子は枝分かれしたものが好ましく、枝分かれした末端に金属結合性官能基がある場合が特に好ましい。高分子の主鎖に金属結合性高分子が複数含まれている場合、親水性高分子は表面に横たわり、非特異的吸着を抑制する能力が劣るため好ましくない。

枝分かれの部分の長さはほぼ同等であることが好ましく、中心部から複数の同じ長さの分子が広がっている親水性高分子がさらに好ましい。枝分かれした末端に金属結合性官能基がある場合、枝分かれ部の長さがまちまちであると、多数の金属結合性官能基がフリーのまま残る可能性があり、好ましくない。例えば、マルチアームタイプの分子、1～4世代の比較的若い世代のデンドリマーなども挙げられる。

【0016】

親水性高分子としては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリ(メタ)アクリル酸、ポリ(メタ)アクリル酸塩、ポリ(メタ)アクリルアミド、ポリエチレンイミン、ポリビニルピロリドン、カルボン酸もしくはその塩やスルホン酸もしくはその塩を含有するモノマーまたはポリエチレングリコール等の親水性部分を共重合させたポリエステルやポリウレタン、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、さらにはキトサン、カラギーナン、グルコマンナンなどの多糖類が挙げられる。

【0017】

これらの中でも、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ(メタ)アクリルアミド、ポリビニルピロリドン等のOH基、カルボン酸やその塩、アミン、イミンなど反応性を有する部分を持たないものが好ましく、最も好ましくはPEGである。PEGは親水性が高く、反応性の有する官能基がないため非特異吸着を抑制する効果が高い。なお、これら親水性高分子は本発明で使用される分子の一部として含まれている。

【0018】

金属結合性官能基はイオウを含む官能基が好ましく、特にチオール基もしくはジスルフィド基であることが好ましい。これらの官能基は金属、特に金基板への吸着結合に最適であるためである。従って、バイオチップ基板は金であることが好ましい。

【0019】

バイオチップとしては表面プラズモン共鳴測定用もしくは水晶発振子測定用が好ましい。いずれも生体分子を放射線同位体や蛍光分子でラベルする必要がなく、物質間の相互作用をリアルタイムに評価することができる。

【0020】

表面プラズモン共鳴法による分析に供されるためには、本発明のバイオチップは金で被覆された透明基板であることが好ましい。

特に表面プラズモン共鳴イメージング法は、バイオチップ表面に複数の物質を固定化したアレイを作製し、同時に複数の物質の相互作用を観察することができるため好ましい。

【0021】

バイオチップは生体分子を固定化する部分(固定化部)と、生体分子を固定化しないバックグラウンド部に区画化されており、バックグラウンド部に、複数の金属結合性官能基を有する親水性高分子が固定化されていることが好ましい。バックグラウンド部に非特異的吸着を抑制する親水性高分子を固定化することで、固定化部とバックグラウンド部のシグナルの変化が明確となり、バイオチップとして非常に好ましい。

【0022】

基板上に親水性化合物を固定する方法としては特に限定されるものではないが、溶液中に金属表面を浸漬する公知の自己組織化表面作製方法や、公知のコート法であるスプレーコート、ディッピング、ローラーコート、ナイフコート(ブレードコート)等を用いることができる。

【実施例】

【0023】

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるもの

ではない。

【0024】

[実施例]

末端官能基がチオール基である 4 armPEG (日本油脂製 SUNBRIGHT PTE-100SH) を 1mM の濃度で 7ml のエタノール：水 = 6：1 の混合溶液に溶解させた。4 armPEG の分子量は 10,000 であり、中心からほぼ同等の長さの PEG 鎖が四つ存在する分子であり、親水性が非常に高い。また、PEG の 4 つの末端はすべてチオール基であり、特に金に対する金属結合性を示す。

【0025】

18mm 四方、2mm 厚の SF15 ガラススライドにクロムを 3nm 蒸着し、金を 45nm 蒸着した金蒸着スライドを、上記 4 armPEG チオール溶液に 3 時間浸漬させ、金基板全体に 4 armPEG チオールを結合させた。

【0026】

このスライドの上に図 1 に示すフォトマスクを載せ、500W 超高压水銀ランプ (ウシオ電機製) で 2 時間照射し、UV 照射部の 4 armPEG チオールを除去した。フォトマスクには 0.5mm 四方の穴が 96 個あいており、穴があいている部分で UV 光が透過してスライドに照射される。

【0027】

次に 7-カルボキシー-1-ヘプタンチオール (7-CHT：同仁化学研究所) の 1mM 溶液中にスライドを 2 時間浸漬し、UV 照射部にアミノ基を導入するとともに、4 armPEG が 7-CHT へと交換されるかどうかを確認した。

【0028】

交換反応が起こったかどうかを確認する手段として、表面プラズモン共鳴イメージング機器 (東洋紡績製) にチップをセットし、チップ表面へのポリリリジンの吸着を観察した。測定は 10mM リン酸緩衝液、150mM NaCl、pH 7.4、30℃ で実施した。10μg/ml の濃度で分子量 4000-15000 のポリリリジン (シグマ社製) を溶解させた上記のリン酸緩衝液を 5 分間接触させた。ポリリリジンは正電荷を有するポリマーであり、7-CHT が結合されてカルボキシル基が導入された部分に静電的に結合する特性を有する。

【0029】

図 2 に SPR シグナルの変化を示す。ポリリリジンによるシグナル量を、ポリリリジンを流す 3 分前とポリリリジンを流し終わってから 5 分後のシグナル値の変化を測定した。7-CHT 導入部のシグナルは、96 箇所の 7-CHT 導入部のシグナル平均値とした。4 armPEG 部のシグナルは列方向の間隔の部分で 11 箇所の縦に長い長方形を取ってシグナル平均値とした。7-CHT 導入部 (UV 照射部) のポリリリジンによるシグナルは 13.9 であった。それに対し、4 armPEG 結合部におけるポリリリジンによるシグナルは 1.5 であり、シグナル比は 9.1 であった。これは、4 armPEG 結合部に対する 7-CHT の交換反応がほとんど起こらなかったことを意味する。4 armPEG は長いアルキル鎖は有さないものの、複数点で金に結合しているため、金表面からの脱離がほとんどおこらなかったと考えることができる。

【0030】

このように安定で、脱離しにくい親水性高分子が固定化されたバイオチップを容易に得ることができた。本実施例のバイオチップは UV 照射部のみに導入された 7-CHT のカルボキシル基を起点として生体分子を結合することができる。4 armPEG 固定化部には官能基がほとんど存在せず、非特異的吸着が抑制することができる。

【0031】

[比較例]

一つの分子にチオール基を一つだけ有する PEG チオール (日本油脂製 SUNBRIGHT MESH-50H) を 1mM の濃度で 7ml のエタノール：水 = 6：1 の混合溶液に溶解させた。PEG チオールの分子量は 5000 であり、親水性が非常に高い。上述の

ように PEG チオール の一方の末端は金属結合性を有するチオール基であり、もう一方の末端はメトキシ基である。PEG チオール のアルキル鎖部分は炭素数 2 であり、分子間の疎水性結合は強くない。

【0032】

18mm 四方、2mm 厚の SF15 ガラススライドにクロムを 3nm 蒸着し、金を 45nm 蒸着した金蒸着スライドを、上記 PEG チオール 溶液に 3 時間浸漬させ、金基板全体に PEG チオール を結合させた。

【0033】

このスライドの上に図 1 に示すフォトマスクを載せ、500W 超高压水銀ランプ（ウシオ電機製）で 2 時間照射し、UV 照射部の PEG チオール を除去した。

次に 7-カルボキシ-1-ヘプタンチオール（7-CHT：同仁化学研究所）の 1mM 溶液中にスライドを 2 時間浸漬し、UV 照射部にアミノ基を導入した。

【0034】

次に実施例と同様に 7-カルボキシ-1-ヘプタンチオール（7-CHT：同仁化学研究所）の 1mM 溶液中にスライドを 2 時間浸漬し、UV 照射部にアミノ基を導入するとともに、4arm PEG が 7-CHT へと交換されるかどうかを確認した。

【0035】

交換反応が起こったかどうかを確認する手段として、実施例と同様に $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のポリリジンをリン酸緩衝液に溶解した溶液がバイオチップに結合するのを観察した。

【0036】

図 3 に SPR シグナルの変化を示す。7-CHT 導入部（UV 照射部）のシグナルは 16.9 であったのに対し、PEG チオール 結合部における PEI によるシグナルは 11.9 であり、シグナル比は 1.4 であった。これは、PEG チオール 結合部に対する 7-CHT の交換反応が起こり、PEG 部分にもカルボキシル基が存在していることを意味する。PEG チオール は長いアルキル鎖は有さないだけでなく、金結合性官能基は一つだけなので、容易に金表面からの脱離したと考えることができる。従って、PEG チオール 部分は不安定であり、PEG 結合部分にも生体分子が結合できる。また、静電的な非特異結合は多いと推察される。

【産業上の利用可能性】

【0037】

本発明により、1 ステップで親水性高分子をバイオチップ表面に結合させることができ、親水性高分子は複数の金属結合性官能基を有するためにチップ表面から脱離しにくく、非特異的吸着を大きく低減させることができ、産業界に寄与すること大である。

【図面の簡単な説明】

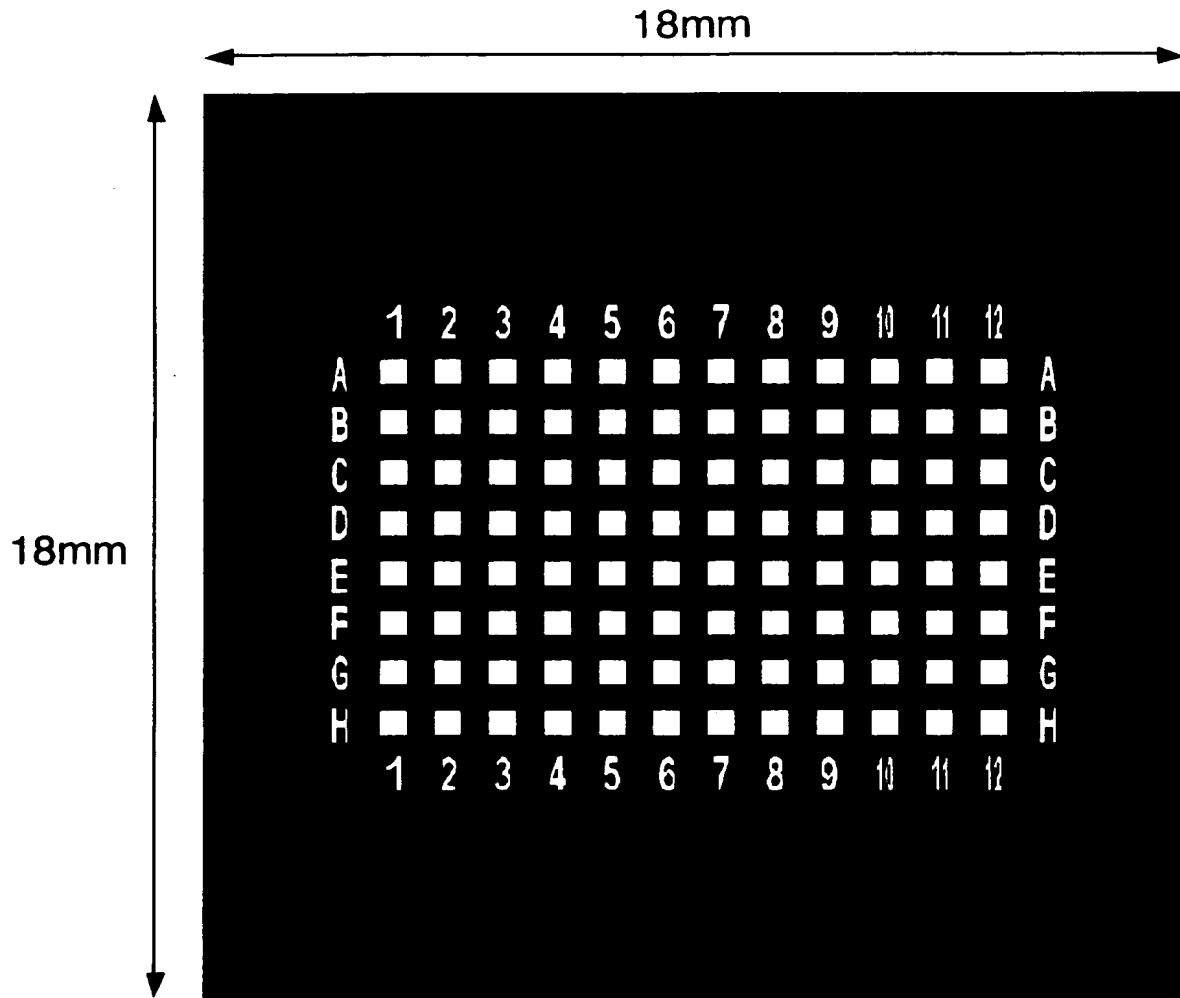
【0038】

【図 1】 実施例、比較例で使用したフォトマスク

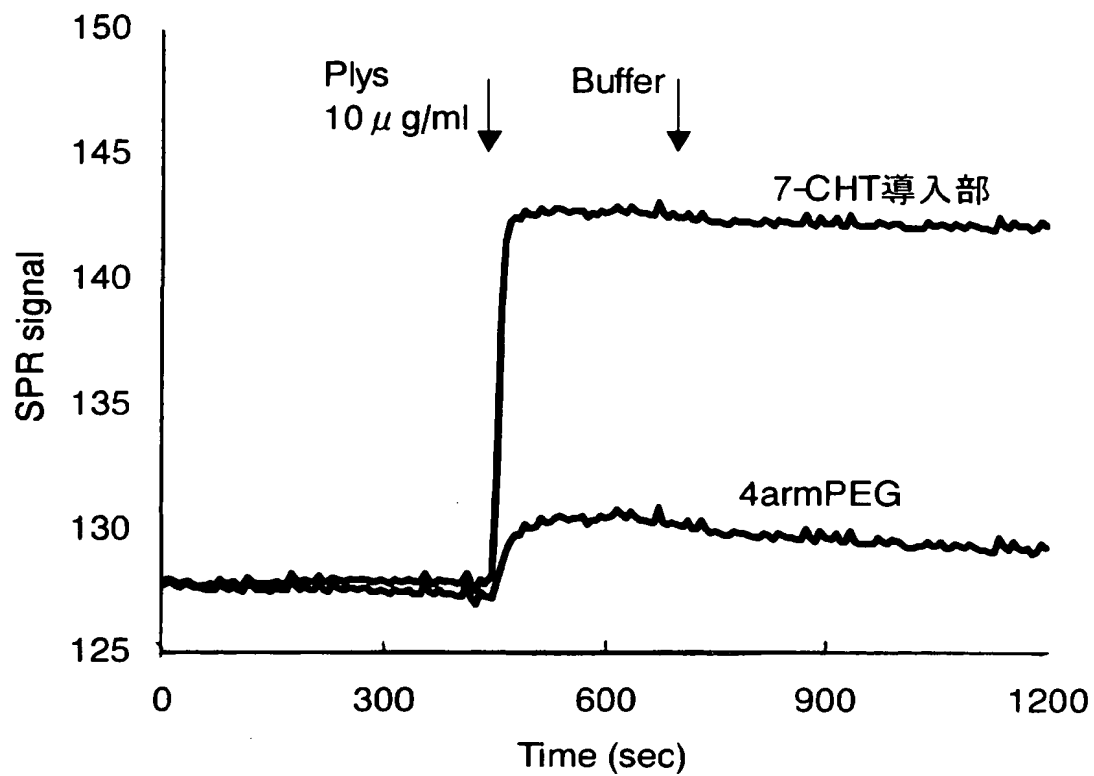
【図 2】 実施例においてポリリジンを流したときの SPR シグナル変化

【図 3】 比較例においてポリリジンを流したときの SPR シグナル変化

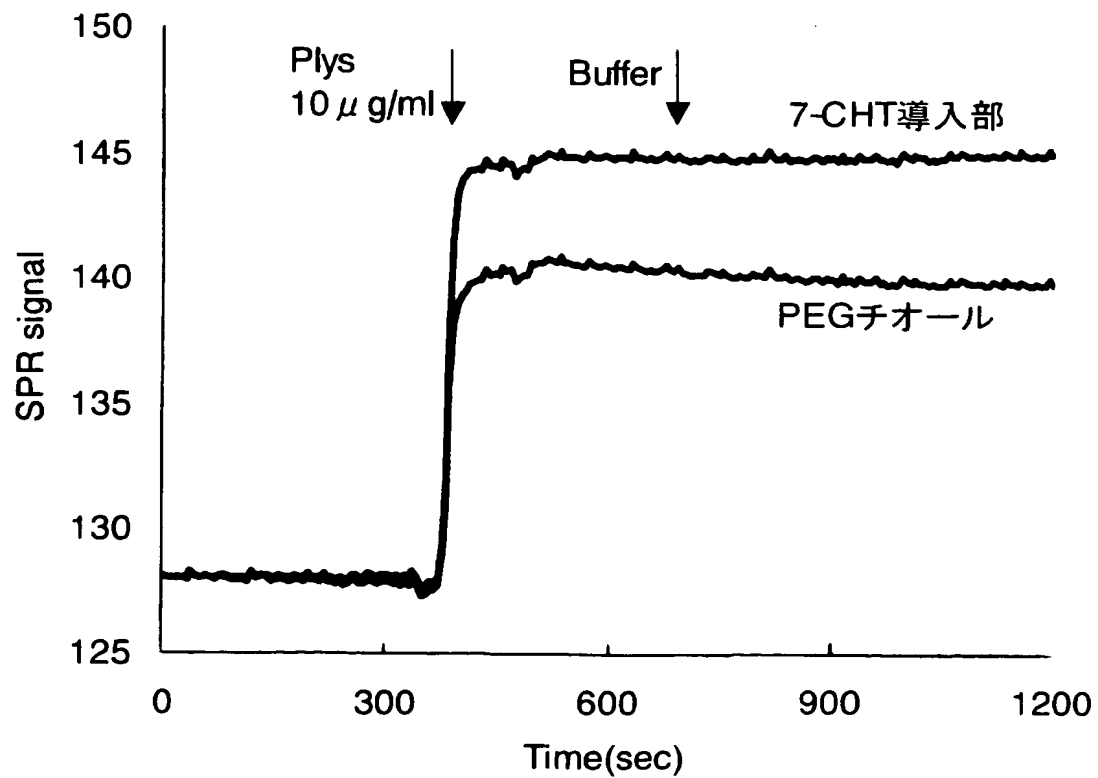
【書類名】 図面
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 非特異的吸着を抑制できるバイオチップを得ることにある。特に区画化されているチップにおいて、バックグラウンド部にほとんど官能基を有さないバイオチップを得る。

【解決手段】 複数の金属結合性官能基を有する親水性高分子が表面に結合しているバイオチップ。親水性高分子の分子量が1, 0 0 0 以上で、枝分かれしてあることが好ましく、親水性高分子としてはポリエチレングリコールが好ましい。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 3 3 0 7 2
受付番号	5 0 3 0 1 5 7 8 7 7 3
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 5 年 9 月 2 6 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年 9月25日

特願 2 0 0 3 - 3 3 3 0 7 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 3 1 6 0]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 1 0 日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号
氏 名	東洋紡績株式会社